



HAL
open science

Manuel de travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique

Mohammed Gagaoua

► **To cite this version:**

Mohammed Gagaoua. Manuel de travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique. Master. Enzymologie générale et génie enzymatique, Algérie. 2016, pp.25. hal-04308312

HAL Id: hal-04308312

<https://hal.inrae.fr/hal-04308312>

Submitted on 27 Nov 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

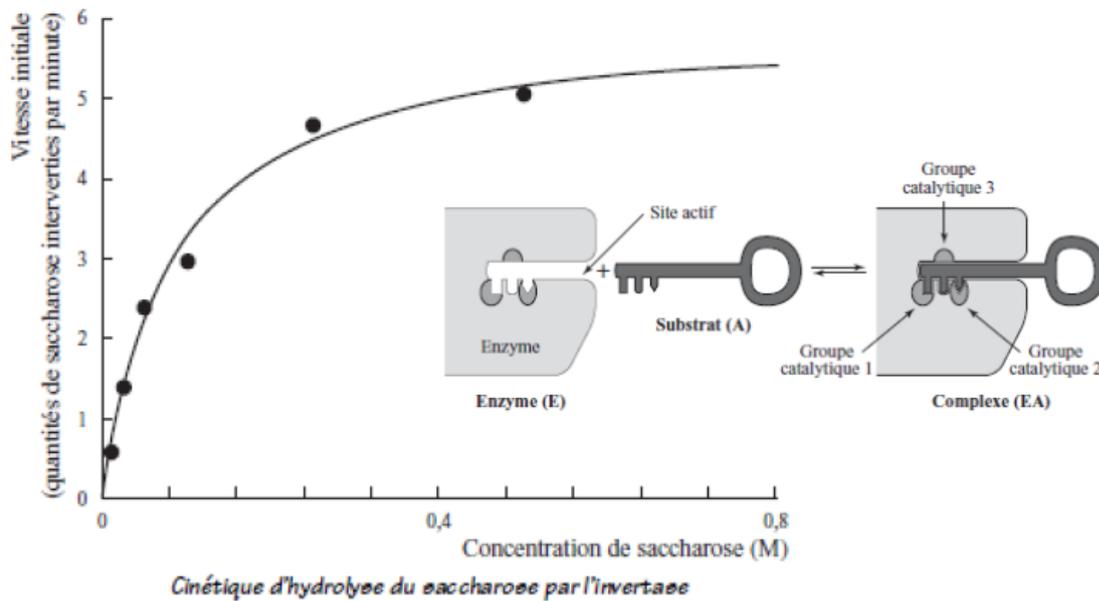


Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Frères Mentouri Constantine 1
Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies
Agro-Alimentaires
(I.N.A.T.A-A)

Manuel de travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique



Manuel élaboré et rédigé par Dr. Mohammed GAGAOUA

Mail: gamber2001@yahoo.fr



INATAA-UFMC1 -2016

Programme de travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique

Préambule

Premier secteur industriel où l'homme a exploité la catalyse enzymatique, le **domaine agroalimentaire** offre de multiples et diverses raisons d'utiliser les enzymes. Elles sont essentiellement soit d'ordre technologique ou économique. Les gros consommateurs d'enzymes sont l'industrie des détergents, la fromagerie, l'amidonnerie et d'autres industries alimentaires (secteurs des boissons, boulangerie-pâtisserie, confiserie...).

L'une des enzymes utilisée dans le secteur des industries agro-alimentaires (**IAA**) est l'**invertase ou β -fructofuranosidase (EC3.2.1.26)**. L'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, est une enzyme qui catalyse le clivage de la liaison 1-4 glycosidique du saccharose et libère un mélange équimolaire de D-glucose et D-fructose connu sous le nom de sucre inverti. Ce dernier est largement utilisé dans les IAA. Vu son utilisation si importante dans les IAA et en particulier celle des industries des sucres et des boissons à base du sucre inverti, l'**invertase** fera l'objet de travaux pratiques (**TP**).

Par ailleurs, d'autres enzymes d'intérêt agro-alimentaires sont utilisées, en particulier les protéases. Ces dernières sont par exemple utilisées en fromagerie pour initier la coagulation du lait. Les enzymes protéolytiques coagulantes du lait sont d'origine diverse, végétale, animale, microbienne et de synthèse. Les enzymes coagulantes vont aussi être abordées dans les TP d'enzymologie en utilisant une enzyme d'origine végétale, la cucumisine (**EC 3.4.21.25**) du concombre.

Le programme détaillé de l'ensemble des travaux pratiques est donné ci-après.

Instructions concernant les travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique	1
TPn°01 : Préparation des tampons et solutions.	2
TPn°02 : Courbes d'étalonnage de l'invertase.....	4
TPn°03 : Test de l'activité enzymatique de l'invertase.....	6
TP n°04 : Dosage des protéines par la méthode Bradford et calcul de l'activité spécifique de l'invertase....	8
TPn°05 : Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par l'invertase.	10
TPn°06 : Etude de l'influence du pH sur l'activité de l'invertase.....	12
TPn°07 : Etude de l'effet de la température sur l'activité de l'invertase.	14
TPn°08 : Détermination des constantes cinétiques K_m et V_{max} de l'invertase.	16
TPn°9 : Extraction de la Cucumisine - une enzyme coagulante du lait - du <i>Cucumis sativus</i> L.	18
TPn°10 : Mise en évidence de l'activité coagulante de la cucumisine extraite de <i>C. sativus</i>	21

INSTRUCTIONS

« Travaux pratiques d'enzymologie générale et génie enzymatique »

Veillez au respect de ces instructions pour le bon déroulement des TPs d'enzymologie générale et génie enzymatique.

1. Le port de la blouse est **obligatoire** avant d'entrer au laboratoire ;
2. Pour chaque TP, vous devez préparer une fiche technique sur une seule demi-fiche cartonnée recto-verso (de préférence de couleur blanche). Elle doit être personnelle, individuelle et s'inspirer du Topo de chaque TP et non une copie intégrale. Elle doit comporter : le but, le principe et le mode opératoire sous forme de schéma illustratif et détaillé ;
3. Les comptes rendus sont préparés par sous-groupe de paillasse et remis la séance d'après. **Aucun retard de remise du compte-rendu ne sera toléré.** Chaque compte-rendu comprend 2 à 3 pages au format A4 (210 mm × 297 mm - feuilles blanches), incluant les parties suivantes : résultats (détaillés), la discussion des résultats et la conclusion par rapport au TP réalisé. Il est inutile de réécrire la partie Matériel et Méthodes (méthodologie);
4. Evitez d'écrire au stylo rouge ou rose que ce soit sur la fiche technique ou sur le compte rendu ;
5. Veuillez vous munir de trombones, de marqueur indélébile, du scotch et d'un **chronomètre** (un par groupe de paillasse est suffisant) ;
6. Vous êtes répartis en sous-groupes et aucune permutation n'est autorisée sans l'autorisation de l'enseignant responsable de la séance du TP en cours ;
7. Les étudiants répétitifs dont la moyenne des TPs obtenue durant l'année précédente est égale ou supérieure à 10/20 sont dispensés des TPs ;
8. A la fin de chaque TP, la verrerie doit être lavée et la paillasse nettoyée. Une note de paillasse est attribuée à chaque groupe de paillasse et pour chaque TP réalisé (une moyenne sera calculé sur l'ensemble des TP à la fin de l'année) ;
9. La participation et l'assiduité de chaque étudiant sera notée à chaque TP, pour être comptabilisée dans la note finale ;
10. Votre présence au TP est obligatoire. Toute absence doit être justifiée auprès de (s) l'enseignant(s) qui a (ont) assuré la (les) séance (s) du TP.

TP n°01 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Préparation des tampons et solutions »

- 1. But :** Préparation des tampons et solutions nécessaires à l'ensemble des TP d'enzymologie.
- 2. Principe :** les notions de préparation de tampons et solutions chimiques acquises au module de chimie analytique seront appliquées lors de ce TP. Il consiste d'appliquer la formule de Henderson–Hasselbalch pour préparer le (s) tampon (s) de solubilisation de l'invertase.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \left[\frac{\text{espèces basiques}}{\text{espèces acides}} \right]$$

On procédera aussi à la préparation de la solution DNS nécessaire au dosage des sucres invertis.

3. Matériel

- Plaque chauffante et agitatrice ;
- Vortex ;
- Spatules ;
- Tubes à essais ;
- Balance analytique ;
- Bêchers ;
- Fioles jaugées ;
- Papier aluminium ;
- Papier Whatman ;
- Portoirs ;
- pH mètre ;
- Barreaux magnétiques.

4. Réactifs et matériel biologique

- Tartrate de potassium sodique ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ;
- Phosphate de sodium monobasique (NaH_2PO_4) ;
- Phosphate de sodium dibasique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ;
- Glycine
- Acétate de sodium ;
- L'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) ;
- Eau distillée ;
- NaOH et HCl ;
- Saccharose, Glucose et Fructose ;
- Invertase pure de *Saccharomyces cerevisiae*

5. Mode opératoire

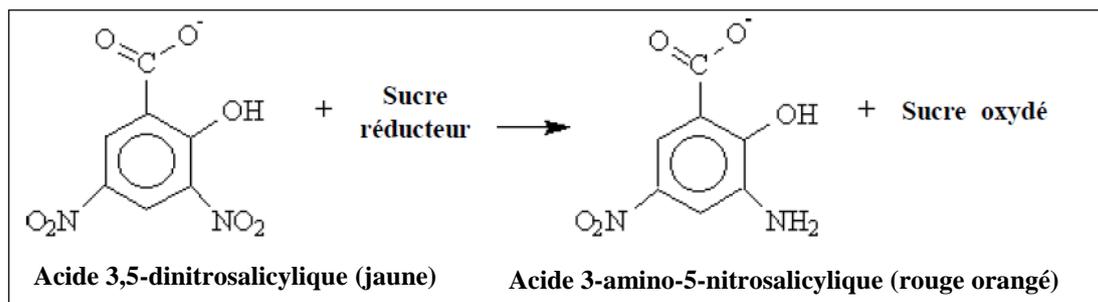
- Ⓔ Préparer les tampons : glycine 25mM, pH 3.0, acétate 30mM, pH 4.5 et phosphate à 40 mM, pH 7.0 ;
- Ⓔ La solution de dinitrosalicylate (5g DNS, 8g soude (NaOH), 150g Tartrate de potassium sodique /500 mL qsp d'eau distillée) est préparée à l'abri de la lumière (obscurité) puis filtrée et conservée dans un flacon couvert d'aluminium
- Ⓔ Pour sa préparation on procède comme suit : mettre 150 g de tartrate de potassium sodique dans une fiole de 500 mL, ajouter 8 g de soude. Dissoudre complètement le mélange (en chauffant doucement) dans 300 mL d'eau distillée environ. Ajouter doucement 5g de DNS. Couvrir avec du papier

aluminium et attendre la dissolution du DNS. Laisser refroidir et compléter le volume à 500 mL. Boucher la fiole et conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

- Ⓔ Préparer la solution enzymatique de l'invertase à raison de 0.1g/20 mL dans un tube à essai. Peser 0.1 g d'enzyme lyophilisée (pure) et la solubilisée dans le tampon approprié (tampon glycine, acétate et phosphate). Agiter doucement durant 5 à 10 minutes sur une plaque agitatrice réglée à 200 trs/min. Solution enzymatique à conserver à 4°C pendant plusieurs semaines.
- Ⓔ Préparer les solutions des sucres nécessaires pour réaliser les courbes d'étalonnage. Solution de saccharose à 100 mM et invertose à 5 mM qu'il faut préparer dans des tubes à essais pour un volume final de 20 mL.

TP n°02 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Courbes d'étalonnage de l'invertose »

- But :** Réalisation des courbes d'étalonnage de l'invertose et dosage des sucres réducteurs.
- Principe :** il consiste de réaliser des gammes de concentration différentes en saccharose et invertose, et dosage du taux des sucres réducteurs dans des tampons adéquats par la méthode au DNS (acide 3,5 dinitrosalicylique), méthode de **Miller (1959)**.



En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les sucres réducteurs en acide 3-amino-5-nitrosalicylique rouge orangé.

3. Matériel

- Spectrophotomètre à $\lambda = 540 \text{ nm}$;
- Vortex ;
- Tubes à essais ;
- Bain marie bouillant ;
- Portoirs ;
- pH mètre ;
- Micropipettes avec embouts respectifs ;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique.

4. Solutions et tampons

- Solution 3,5-DNS ;
- Tampon phosphate pH 7.0 ;
- Tampon glycine pH 3.0 ;
- Tampon acétate pH 4.5 ;
- Eau distillée ;
- Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL eau distillée (ED)) ;
- Solution invertose (1 Glucose + 1 Fructose/1000 mL ED) à 5mM

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir une série de 6 tubes à essais numérotés de 0 à 5 ;
- ☒ Réaliser une gamme d'étalonnage selon le tableau 01 (au final 3 courbes, pour 3 tampons) ;
- ☒ Mettre le volume nécessaire de la solution du saccharose, puis celle de l'invertose dans chaque tube à essai ;
- ☒ Agiter les tubes au vortex ;

- ☒ Ajouter dans l'ensemble des tubes 1,5 mL du tampon adéquat (pH 3.0, 4.5 et 7.0) pour un volume final de 2,5 mL ;
- ☒ Ajouter immédiatement à l'aide d'une micropipette 1,5 mL de la solution du DNS ;
- ☒ Boucher les tubes avec du papier aluminium, puis homogénéiser au vortex avant de les porter exactement 5 minutes au bain marie réglé à 100°C ;
- ☒ Après incubation, laisser refroidir les tubes environ 5 minutes à l'eau courante ;
- ☒ Effectuer la lecture au spectrophotomètre à 540 nm contre le témoin (tube 0) en mettant environ 2 mL du mélange réactionnel dans des cuves visibles.

Tableau 01 : Gamme d'étalonnage à utiliser pour le dosage de l'invertose

Tubes	0	1	2	3	4	5
Saccharose (100mM) en μL	1000	800	600	400	200	0
Invertose (5mM) en μL	0	200	400	600	800	1000
Tampon adéquat en μL	1500					
Mélange final en μL	2500					
3,5-DNS en μl	1500					
Absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$)

6. Résultats

- ☒ Tracer séparément sur feuilles millimétriques les courbes d'étalonnage $DO = f$ (nombres de moles de sucre inverti en μM ou mM/tube) ;
- ☒ Déterminer les équations de ces courbes d'étalonnage à l'aide du tableur Excel 2003 ou 2007 .

TP n°03 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Test de l'activité enzymatique de l'invertase »

1. **But :** Mise en évidence de l'activité saccharitique d'une invertase d'origine eucaryote (*Saccharomyces cerevisiae*).

2. **Principe :** Les enzymes sont des molécules protéiques ou glycoprotéiques qui catalysent spécifiquement les réactions du métabolisme des êtres vivants. L'activité de ces molécules peut être utilisée dans le dosage de nombreux composés. Cette activité enzymatique est exprimée en unités internationales ou U, telle qu'une unité internationale provoque la transformation d'une micromole de substrat en une minute dans les conditions optimales. Ainsi, dans notre cas l'activité saccharitique (enzyme = invertase) est déterminée en présence du saccharose (substrat) dans une solution tampon d'acétate de sodium.

3. Matériel

- Bain-marie thermostaté à 40 et 100 °C ;
- Spectrophotomètre à $\lambda = 540$ nm ;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
- Micropipettes de 100 et 1000 μ l avec embouts ;
- Chronomètre ;
- Portoirs ;
- Vortex ;
- Tubes à hémolyse ou à essais ;
- pH mètre.

4. Solutions et tampons

- Tampon acétate pH 4.5 ;
- Solution 3,5-DNS ;
- Eau distillée
- La glace ou eau du robinet froide ;
- Invertase pure de *S. cerevisiae* ;
- Solution NaOH ou HCl à 1N ;
- Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL tampon d'acétate) ;

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir trois tubes à essais marqués Témoin (1) et Test (2) ;
- ☒ Réaliser le mélange réactionnel (Enzyme + Substrat) dans les deux tubes Test avec 100 μ L de l'invertase pure et 900 μ L de la solution de saccharose à 100 mM ;
- ☒ Réaliser le tube Témoin avec 900 μ L de la solution de saccharose ;
- ☒ Boucher les tubes et homogénéiser au vortex ;
- ☒ Incuber les 3 tubes à 40 °C au bain-marie pendant 10 minutes ;
- ☒ Stopper la réaction enzymatique du mélange, en additionnant 1,5 mL de la solution DNS ;
- ☒ Porter subséquemment le mélange à ébullition pendant 5 minutes exactement ;
- ☒ En même temps, ne pas oublier de réaliser le témoin (essai à blanc) correspondant à la solution de saccharose incubée sans enzyme à 40 °C pendant 10 minutes, en rajoutant par la suite 1,5 mL de la solution DNS puis 0,1 mL d'enzyme ;

Ⓔ Enfin, réaliser la lecture des absorbances à $\lambda = 540$ nm, après refroidissement des tubes à l'eau courante.

6. Expression des résultats

Comme cité ci-haut, une unité d'activité saccharitique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucres réducteurs (équivalent en invertose), par minute, dans un mL de l'enzyme pure et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. L'activité de l'invertase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité invertase (U/ml)} = \frac{(C_x - C_t) D}{t}$$

C_x : Concentration des sucres réducteurs du mélange réactionnel (μ mole/ml).

C_t : Concentration des sucres réducteurs du mélange témoin (μ mole/ml).

D : facteur de dilution.

t : temps d'incubation (minutes).

TP n°04 d'enzymologie générale et génie enzymatique

« Dosage des protéines par la méthode Bradford et détermination de l'activité spécifique »

Préambule

Les protéines sont composées d'acides aminés. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour leur dosage. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses propriétés spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines. Le choix d'une méthode de dosage dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances interférentes dans l'échantillon...etc.

1. But: Dosage des protéines par la méthode (**Bradford1976**).

2. Principe : La concentration des protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). C'est une méthode colorimétrique qui utilise le bleu de Coomassie G-250. Ce dernier se lie aux protéines, provoquant l'augmentation de l'absorbance de 365 à 595nm. Une fois lié aux protéines sa couleur vire du rouge vers le bleu. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à de faibles concentrations, inférieures à 20µg/mL. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. La densité optique des échantillons est mesurée au spectrophotomètre à 595nm. Une solution de sérum albumine bovine (1mg/mL) est utilisée comme standard pour réaliser la courbe étalon.

3. Matériel

- Spectrophotomètre à $\lambda=595\text{nm}$;
- Tubes à essais;
- Micropipettes de 100 et 1000µ;
- Chronomètre;
- Cuve visible de 1cm de trajet optique;
- Vortex;
- Portoirs;

4. Solution et tampons

- Tampon acétate pH4.5;
- Solution de Bradford;
- Eau distillée
- Solution de SAB (sérum albumine bovine)

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir une série de tubes à essais numérotés de 0 à 5;
- ☒ Réaliser une gamme d'étalonnage selon le tableau 01;
- ☒ Mettre le volume nécessaire de la solution SAB à concentration finale de 1mg/mL;
- ☒ Ajouter dans chaque tube le volume nécessaire du tampon adéquat (ici le tampon acétate de Na) ;

- ☒ Ajouter dans l'ensemble des tubes 3mL du réactif Bradford;
- ☒ Boucher les tubes, puis homogénéiser au vortex avant de les garder à l'obscurité pendant exactement 5min;
- ☒ Effectuer la lecture au spectrophotomètre à $\lambda=595\text{nm}$ en mettant environ 2mL du mélange réactionnel dans des cuves visibles.

Tableau 01 : Gamme d'étalonnage à utiliser pour le dosage des protéines.

Tubes	0	1	2	3	4	5	
Gamme SAB en ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0	10	20	30	40	50	Après avoir
SAB (μL)	0	5	10	15	20	25	
Tampon acétate de Na(μL)	100	95	90	85	80	75	réalisé
Réactif Bradford (μL)	3000						deux

courbes d'étalonnage par la paillasse 1 et 2, les autres paillasses (3et4) prendront en charge le dosage des protéines de la solution enzymatique de l'invertase.

- ☒ Préparer dans un portoir trois tubes à essais marqués Témoin(1) et Test (2);
- ☒ Réaliser le mélange (solution enzymatique + tampon) dans les deux tubes Test avec 25 μL de la solution enzymatique et 75 μL de la solution tampon d'acétate de Na;
- ☒ Réaliser le tube Témoin avec 100 μL de la solution tampon;
- ☒ Ajouter dans l'ensemble des tubes 3mL du réactif Bradford;
- ☒ Boucher les tubes, puis homogénéiser au vortex avant de les garder à l'obscurité pendant exactement 5min;
- ☒ Effectuer la lecture au spectrophotomètre à $\lambda=595\text{nm}$ en mettant environ 2mL du mélange réactionnel dans des cuves visibles.

6. Résultats

- ☒ Tracer sur une feuille millimétrique la courbe $\text{DO}=f([\text{SAB}])$;
- ☒ Déterminer l'équation de la courbe d'étalonnage à l'aide du tableur Excel 2003 ou 2007 ;
- ☒ Déterminer à l'aide de la courbe d'étalonnage la quantité d'invertase en μg de protéines présente dans la solution enzymatique utilisée dans le précédent TP et calculer l'activité spécifique en utilisant la formule (Activité enzymatique/teneur en protéines).

TP n°05 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par l'invertase »

1. **But** : Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique.
2. **Principe** : Opérer en présence d'enzyme (invertase) et de substrat (saccharose) à concentration constante, en milieu adéquat tamponné à pH=4,5 et thermostaté à 40°C. Dans ce cas, on fait varier le temps de contact entre le substrat et l'enzyme. Afin de pouvoir mesurer la vitesse initiale avec une bonne approximation, il faut se situer dans la zone où la vitesse forme un palier pendant un temps suffisamment long (un lap de temps de 3 minutes), ce que l'on peut facilement vérifier en rapportant en continu l'apparition du produit formé (invertose ou sucre inverti).
3. **Matériel**
 - Bain-marie thermostaté à 40 et 100 °C ;
 - Spectrophotomètre à $\lambda = 540 \text{ nm}$;
 - Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
 - Micropipettes de 100 et 1000 μl avec embouts ;
 - Chronomètre ;
 - Portoirs ;
 - Vortex ;
 - Tubes à essais ;
 - pH mètre.
4. **Solutions et tampons**
 - Tampon acétate pH 4.5 ;
 - Solution 3,5-DNS ;
 - Eau distillée
 - La glace ou eau du robinet froide ;
 - Solution d'invertase pure de *S. cerevisiae* ;
 - Solution NaOH ou HCl à 1N ;
 - Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL tampon d'acétate) ;
5. **Mode opératoire**
 - ☒ Préparer dans un portoir une série de tubes à essais numérotés de 0 à 5 ;
 - ☒ Réaliser le mélange réactionnel dans les 6 tubes avec 2000 μL du tampon acétate pH 4.5 et 400 μL de la solution de saccharose à 100 mM (tableau 01) ;
 - ☒ Boucher et homogénéiser les tubes au vortex avant de les préincuber au bain marie à 40 °C pendant 5 minutes ;
 - ☒ Ajouter uniquement dans le tube témoin (tube n°0), 1500 μL de la solution 3,5-DNS ;
 - ☒ Ajouter subséquemment dans tous les tubes 0,1 mL de la solution enzymatique et les porter au bain marie thermostaté à 40 °C ;
 - ☒ A des intervalles de temps de trois minutes, prélever un tube et achever ainsi la réaction enzymatique en incubant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 5 minutes, après avoir stopper la réaction enzymatique du mélange, en additionnant 1,5 mL de la solution DNS ;

- Enfin, effectuer la lecture au spectrophotomètre à 540 nm, après refroidissement de chaque tube dans l'eau froide. La lecture s'effectue dans une cuve visible contre le témoin (tube 0) en prélevant environ 2 mL du mélange réactionnel.

Tableau 01 : Méthode de détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose par l'invertase

Tubes	0	1	2	3	4	5
Saccharose (100mM) en μL	400					
Tampon acétate (pH 4.5) en μL	2000					
Mélange final en μL	2400					
	<i>Préincuber 5 minutes à 40 °C</i>					
3,5-DNS en μL	1500					
Invertase pure (0.1g/20 mL) en μL	100					
Incuber à 40 °C pendant (en min)	0	3	6	9	12	15
3,5-DNS en μL		1500				
Absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$)

6. Résultats

- Tracer sur une feuille millimétrique la courbe $DO = f(t \text{ en min})$;
- Tracer sur la même feuille millimétrique la courbe $[P] = f(t \text{ en min})$ ou $P = \text{produit d'hydrolyse (sucres réducteurs ou invertose)}$;
- Calculer la vitesse initiale de la réaction (V_i) en $\mu\text{mol de saccharose hydrolysé litre}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

TP n°06 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Etude de l'influence du pH sur l'activité de l'invertase »

7. **But** : Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique.

8. **Principe** : Opérer en présence d'enzyme (invertase) et de substrat (saccharose) à concentration constante, en milieu thermostaté à 40°C, et faire varier le pH du milieu réactionnel de l'enzyme (travailler avec 3 tampons, pH 3.0, pH 4.5 et pH 7.0).

9. Matériel

- Bain-marie thermostaté à 40 et 100 °C ;
- Spectrophotomètre à $\lambda = 540$ nm ;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
- Micropipettes de 100 et 1000 μ l avec embouts ;
- Chronomètre ;
- Portoirs ;
- Vortex ;
- Tubes à essais ;
- pH mètre.

10. Solutions et tampons

- Tampon glycine pH 3.0 ;
- Tampon acétate pH 4.5 ;
- Tampon phosphate pH 7.0 ;
- Solution 3,5-DNS ;
- La glace ou eau du robinet froide ;
- Solution d'invertase pure de *S. cerevisiae* ;
- Solution NaOH ou HCl à 1N ;
- Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL tampon adéquat) ;
- Eau distillée.

11. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir une série de tubes à essais codifiés (01, 11 pour pH 3.0), (02, 22 pour pH 4.5) et (03, 33 pour pH 7.0) ;
- ☒ Réaliser le mélange réactionnel dans les 6 tubes avec 2000 ou 2100 μ L du tampon adéquat aux 3 différents pH et 400 μ L de la solution de saccharose à 100 mM (tableau 01) ;
- ☒ Boucher et homogénéiser les tubes au vortex avant de les préincuber au bain marie à 40 °C pendant 5 minutes ;
- ☒ Ajouter à l'aide d'une P100, 0.1 mL de la solution enzymatique puis incuber immédiatement l'ensemble des tubes (11, 22 et 33) à 40 °C pendant exactement 6 minutes ;
- ☒ Achever la réaction enzymatique en incubant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 5 minutes, après avoir additionné le mélange réactionnel avec 1,5 mL du réactif 3,5-DNS ; puis ajouter 0.1ml d'enzyme dans les tubes témoin (01, 02 et 03)
- ☒ Enfin, effectuer la lecture au spectrophotomètre à 540 nm, après refroidissement de chaque tube dans l'eau froide. La lecture s'effectue dans une cuve visible contre le témoin sans enzyme en prélevant environ 2 mL du mélange réactionnel.

Tableau 01 : Méthode d'étude de l'influence du pH sur l'activité de l'invertase.

Tubes	01	11	02	22	03	33
Saccharose (100mM) en μL	400					
Tampon adéquat 2100 ou 2000 μL	pH 3.0		pH 4.5		pH 7.0	
Mélange final en μL	2400					
	<i>Préincuber 5 minutes à 40 °C</i>					
Invertase pure (0.1g/20 mL) en μL	0	100	0	100	0	100
Incuber à 40 °C (en min)	6					
3,5-DNS en μL	1500					
Absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$)

12. Résultats

1. Tracer la courbes $V_i = f(\text{pH})$.
2. Interpréter l'allure de la courbe.

TP n°07 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Etude de l'effet de la température sur l'activité de l'invertase »

1. But : Etude de l'effet de la température sur l'activité enzymatique.

2. Principe : Opérer en présence d'enzyme (invertase) et de substrat (saccharose) à concentration constante, en milieu tamponné à pH=4.5, et faire varier la température du milieu réactionnel de 20 à 80 °C.

3. Matériel

- Bain-marie thermostaté ;
- Spectrophotomètre à $\lambda = 540 \text{ nm}$;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
- Micropipettes de 100 et 1000 μl avec embouts ;
- Chronomètre ;
- Portoirs ;
- Vortex ;
- Tubes à essais ;
- pH mètre.

4. Solutions et tampons

- Tampon acétate pH 4.5 ;
- Solution 3,5-DNS ;
- La glace ou eau du robinet froide ;
- Eau distillée ;
- Solution d'invertase pure de *S. cerevisiae* ;
- Solution NaOH ou HCl à 1N ;
- Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL tampon acétate) ;

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir une série de tubes à essais codifiés (02, 20), (04, 40), (06, 60) et (08, 80) ;
- ☒ Réaliser le mélange réactionnel dans l'ensemble des tubes avec 2000 ou 2100 μL du tampon acétate pH 4.5 et 400 μL de la solution de saccharose à 100 mM (tableau 01) ;
- ☒ Boucher et homogénéiser les tubes au vortex avant de les préincuber à la température désirée (20, 40, 60 ou 80) pendant 5 minutes ;
- ☒ Ajouter à l'aide d'une P100, 0.1 mL de la solution enzymatique puis incuber immédiatement les tubes correspondant à la température désirée pendant exactement 6 minutes ;
- ☒ Achever la réaction enzymatique en incubant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 5 minutes, après avoir additionné le mélange réactionnel avec 1,5 mL du réactif 3,5-DNS , puis ajouter 0.1ml d'enzyme au tubes témoin (02, 04, 06 et 08) ;
- ☒ Enfin, effectuer la lecture au spectrophotomètre à 540 nm, après refroidissement de chaque tube dans l'eau froide. La lecture s'effectue dans une cuve visible contre le témoin sans enzyme en prélevant environ 2 mL du mélange réactionnel.

Tableau 01 : Méthode d'étude de l'influence de la température sur l'activité de l'invertase

Tubes	02	20	04	40	06	60	08	80
Saccharose (100mM) en μL	400							
Tampon acétate pH 4.5 en μL	2100	2000	2100	2000	2100	2000	2100	2000
Mélange final en μL	2400 ou 2500							
	<i>Préincuber à l'eau tiède pendant 5 minutes</i>							
Invertase pure (0.1g/20 mL) en μL	0	100	0	100	0	100	0	100
Incuber 6 minutes à T°C désirée	20 °C		40 °C		60 °C		80 °C	
3,5-DNS en μL	1500							
Absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$)

6. Résultats

1. Tracer la courbes $V_i = f(T^\circ\text{C})$.
2. Interpréter l'allure de la courbe.

TP n°08 d'enzymologie générale et génie enzymatique
« Détermination des constantes cinétiques K_m et V_{max} de l'invertase »

1. **But :** Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} d'une réaction enzymatique.
2. **Principe :** On mesure la vitesse initiale de la réaction en présence d'enzyme (invertase) à concentration constante, en milieu tamponné pH = 4.5 et thermostaté à 40°C. On fait varier la concentration en substrat (saccharose). Le temps de contact entre enzyme et substrat étant identique dans chaque tube. Les paramètres cinétiques V_{max} et K_m se calculent à partir de l'inverse de la vitesse et de la quantité des sucres réducteurs respectivement.

3. Matériel

- Bain-marie thermostaté à 40 °C ;
- Spectrophotomètre à $\lambda = 540$ nm ;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
- Micropipettes de 100 et 1000 μ l avec embouts ;
- Chronomètre ;
- Portoirs ;
- Vortex ;
- Tubes à essais ;
- pH mètre.

4. Solutions et tampons

- Tampon acétate pH 4.5 ;
- Solution 3,5-DNS ;
- La glace ou eau du robinet froide ;
- Eau distillée ;
- Solution d'invertase pure de *S. cerevisiae* ;
- Solution NaOH ou HCl à 1N ;
- Solution saccharose à 100 mM (3.42g/100 mL tampon acétate) ;

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer dans un portoir une série de 7 tubes à essais numérotés de 0 à 6 ;
- ☒ Réaliser le mélange réactionnel dans l'ensemble des tubes comme indiqué au tableau 01 en utilisant le tampon acétate (pH 4.5) et une solution de saccharose à 100 mM ;
- ☒ Boucher les tubes et homogénéiser au vortex ;
- ☒ Préincuber les 7 tubes à essais pendant 5 minutes au bain marie thermostaté à 40°C ;
- ☒ Ajouter dans tous les tubes un volume constant de 0,1 mL d'enzyme (invertase) ;
- ☒ Laisser les tubes dans le portoir et les incubent immédiatement à 40°C pendant une durée de 9 minutes, tout en remuant les tubes d'un temps à l'autre ;
- ☒ Achever la réaction enzymatique après ajout de 1,5 mL du réactif du 3,5-DNS en incubant le mélange réactionnel à 100 °C pendant 5 minutes ;
- ☒ Enfin, effectuer la lecture au spectrophotomètre à 540 nm, après refroidissement de chaque tube dans l'eau froide pendant 5 minutes. La lecture s'effectue dans une cuve visible en prélevant environ 2mL du mélange réactionnel.

Tableau 01 : Méthode de détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'invertase

Tubes	0	1	2	3	4	5	6
Saccharose (100mM) en μL	0	100	200	400	600	800	900
Tampon acétate pH 4.5 en μL	2400	2300	2200	2000	1800	1600	1500
Mélange final en μL	2400						
Préincuber à 40°C pendant 5 minutes							
Invertase pure (0.1g/20 mL) en μL	100						
Incubation pendant 9 minutes à 40 °C avec agitation							
3,5-DNS en μL	1500						
Absorbance ($\lambda = 540\text{nm}$)

6. Résultats

1. Calculer les valeurs de V_i pour chacune des expériences, à l'aide de la courbe $[P] = f(t)$ obtenue dans le TP n°04 ;
2. Calculer les valeurs de $[S]$ pour chacune des expériences.
3. Tracer les courbes $V_i = f([S])$ et $1/V_i = f(1/[S])$.
4. Déterminer K_M et V_{max} .

Préambule

La coagulation du lait qui est la première étape de la transformation fromagère joue un rôle déterminant sur la qualité du produit fini, le fromager doit donc s'efforcer de la maîtriser au mieux. Il s'agit de la transformation du lait liquide en un gel, appelé aussi coagulum ou caillé qui, après un certain nombre de transformations, deviendra un fromage. Le processus de la coagulation est provoqué par l'action d'un agent coagulant.

Dans le monde, l'agent coagulant (enzyme) le plus utilisé est la présure. Toutefois et pour plusieurs raisons, particulièrement économiques, la présure ne peut répondre à la demande sans cesse croissante et pour cela l'utilisation de succédanés d'origine animale, microbienne ou **végétale** s'est développée.

Les **protéases d'origine végétale** ont été utilisées comme coagulants du lait pour préparer des fromages pendant des siècles soit sous forme d'extraits bruts ou purifiée. Parmi ces enzymes, la **cucumisine (EC 3.4.21.25)**, une sérine protéase thermostable extraite initialement à partir des fruits du melon (*Cucumis melo*) et aujourd'hui dans de nombreuses plantes appartenant à la famille des cucurbitacées dont le concombre (*Cucumis sativus*).

1. But : Extraction de la cucumisine, une enzyme coagulante, du sarcocarpe du concombre.

2. Objectifs

a). Initiation aux techniques d'extraction des protéines : broyage, homogénéisation, solubilisation, filtration et centrifugation.

b). Extraction de l'enzyme coagulante de la chaire ou « sarcocarpe » du concombre (voir **figure 01**).

c). Utilisation de l'extrait enzymatique pour la coagulation du lait (**lors du TP n°12**).

3. Principe : l'extraction consiste en la libération, la séparation et la récupération des enzymes. Cette extraction nécessite le plus souvent des procédés mécaniques. Dans notre cas, nous nous intéressons à la cucumisine présente dans le sarcocarpe du concombre. Après découpe du concombre en petits cubes, un broyage/homogénéisation dans le tampon phosphate de sodium (30mM, pH 6.5) est appliqué pour éclater les cellules et libérer l'enzyme cible. L'homogénat est filtré à travers une gaze pour éliminer les débris cellulaires avant d'effectuer une centrifugation et récupérer le filtrat contenant l'enzyme coagulante du concombre. Ce matériel est désigné sous le nom de l'extrait brut enzymatique du concombre.

4. Matériels

- Spatules
- Béchers
- Scalpel
- Couteau éplucheur
- Eprouvettes
- Papier aluminium ;
- Gazes pour filtration ;
- Verres de montre
- Cristallisoirs
- Plaque agitatrice ;
- Centrifugeuse ;
- Portoirs pour tubes à essais ;
- Fioles jaugées ;
- Entonnoirs ;
- pH mètre ;
- Barreaux magnétiques ;
- Broyeur Ultra-Turrax IKA
- Balance analytique ;

5. Matériel végétal, solutions et réactifs

- Tampon phosphate 30mM, pH 6.5 ;
- Eau distillée ;
- La glace ;
- 2 concombres de l'étalage du marché ;

6. Mode opératoire

Pour extraire les protéines de la chaire « sarcocarpe » du concombre (**figure 01**) il faut suivre les étapes suivantes :

- Eplucher à l'aide d'un couteau éplucheur un concombre et récupérer sa pelure (la peau) dans un verre de montre étiqueté ;
- Epépiner et vider à l'aide d'une spatule l'intérieur du concombre épluché pour récupérer l'ensemble du jus, placentas et graines dans un autre verre de montre étiqueté ;
- Découper (ou hacher) le sarcocarpe (partie à utiliser pour l'extraction) en fines lanières (tranches) puis en petits cubes à l'aide d'un scalpel et récupérer le tout dans un verre de montre étiqueté ;

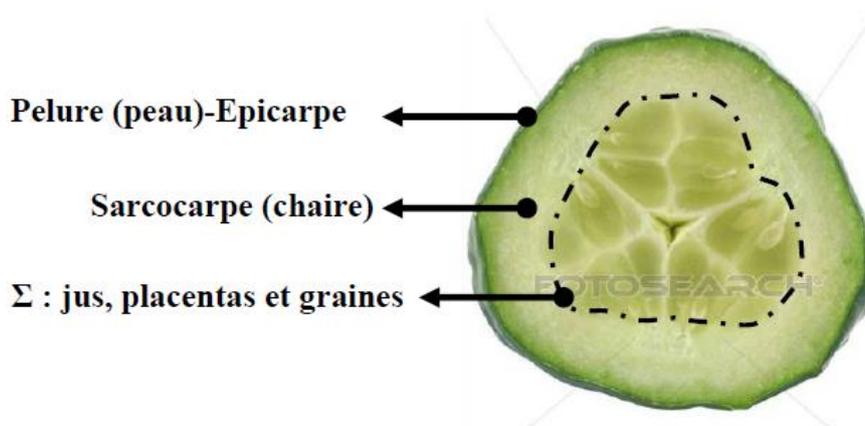


Figure 01 : Section transversale d'un concombre (*Cucumis sativus* L. de la famille des Cucurbitacées).

- Peser environ 45 g du sarcocarpe haché dans un bêcher de 100 mL et ajouter environ 40 mL du tampon phosphate pH 6.5 ;
- Procéder au broyage et homogénéisation à l'aide d'un Ultra-Turrax de type IKA (un broyeur-homogénéisateur) du contenu du bêcher à une vitesse de 15 000x RPM pendant 45 sec (2 fois);
- Mettre le bêcher contenant l'homogénat à l'intérieur d'un cristallisateur contenant de la glace puis laisser sous agitation pour une extraction à froid pendant 20 min ;
- Après extraction, procéder à une filtration sur gaze pour enlever les débris cellulaires ;
- Récupérer le filtrat et le répartir dans des tubes à essais puis centrifuger à une vitesse de 4000 RPM pendant 10 min afin de clarifier le filtrat ;
- Récupérer délicatement le surnageant représentant l'extrait brut enzymatique du concombre (EBEC) et jeter le culot représentant les débris cellulaires restant.
- Collecter les surnageants (EBEC) dans un seul tube étiqueté ;
- Conserver l'EBEC à -20°C jusqu'au TP prochain (TP n°12) pour le dosage des protéines et la mise en évidence de son activité coagulante.

7. Expression des résultats

- Mesurer le pH de l'extrait enzymatique (EBEC) et commenter ;
- Synthétiser en illustrant l'ensemble des étapes de l'extraction des protéines du concombre effectuées dans un diagramme (figure) ;
- Donner dans un tableau le principe et objectif de chacune des étapes réalisées ;
- Effectuer une recherche bibliographique sur les enzymes coagulantes du lait d'origine végétale (comme succédanés de présure) et rapporter le nom scientifique de la plante et la partie utilisée dans un tableau (trois colonnes : nom de l'enzyme, nom de la plante et partie de la plante utilisée).

TP n°10 d'enzymologie générale et génie enzymatique

« Mise en évidence de l'activité coagulante de la cucumisine extraite de *C. sativus* »

Préambule

La coagulation du lait opère par différents mécanismes dont la coagulation enzymatique. Cette dernière se déroule en trois phases. La première est une hydrolyse enzymatique qui concerne l'hydrolyse de la caséine *kappa* (*k*), au niveau de la liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆, conduisant à la formation de la paracaséine *k* (1-105), et de caséinomacropeptide (CMP) (106-169). La libération du CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et par conséquent, une diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial, contribue à la stabilité du système colloïdal. La deuxième phase est l'agglomération, et prend place lorsque environ 80% de la caséine *k* est hydrolysée. La vitesse d'agrégation s'accroît rapidement avec l'état d'avancement de la réaction enzymatique. Enfin, la dernière phase de protéolyse généralisée, où les micelles agrégées subissent de profondes réorganisations : des liaisons de natures variées s'établissent entre les micelles (électrostatiques, hydrophobes et salines) pour former un gel constitué par un réseau lâche emprisonnant le lactosérum. Dans le gel ainsi formé, la caséine est présente sous une forme fortement minéralisée et ce degré de minéralisation élevé confère au **gel présure** des caractères différents de ceux du **gel lactique**. Le **gel présure** est souple, très cohésif, imperméable et contractile.

1. But : Mise en évidence de l'activité coagulante par la détermination du temps de coagulation.

2. Principe : Le temps de coagulation est déterminé en incubant 2 ml de lait écrémé fraîchement préparé dans un tube à essai pré-incubé dans un bain marie à 35°C pendant 10 minutes avec 0,2 ml d'extrait coagulant du concombre obtenu au TP n°11. Le tube à essai est soumis à un mouvement de rotation lente à l'intérieur du bain marie. Puis, on mesure le temps qui s'écoule entre l'introduction de l'extrait coagulant de concombre (EBC) et le moment où un mince film (ou apparition de grumeaux ou flocons du lait) commence à se former à l'intérieur des parois du tube à essai. L'activité coagulante est exprimée en unité coagulante et représente le nombre de volumes de lait frais coagulés par un volume d'extrait coagulant en 40 minutes ($40 * 60 \text{ sec} = 2400\text{sec}$) à 37°C.

3. Matériels

- Micropipettes de 100 et 1000 µL ;
- Cuve visible de 1 cm de trajet optique ;
- Tubes à essais et portoir ;
- Papier aluminium ;
- Chronomètre ;
- Vortex ;
- Bain-marie ;
- Spectrophotomètre ;

4. Solutions

- Tampon phosphate 30mM, pH 6.5 ;
- Eau distillée ;
- Solution de lait (12% lait écrémé, 10mM CaCl₂, pH 6.4) ;
- Solution de Bradford ;

5. Mode opératoire

- ☒ Préparer pour chaque groupe de paillasse et dans un portoir deux tubes à essais marqués (1) et (2) ;
- ☒ Prélever et mettre dans chaque tube, exactement 2 mL de la solution du lait ;
- ☒ Pré-incuber au Bain-marie thermostaté à 35°C les deux tubes pendant 10 min ;
- ☒ Inoculer avec 0,2 mL de l'extrait enzymatique de concombre chaque tube ;
- ☒ Immédiatement après inoculation, chronométrer le temps de coagulation en secondes ;
- ☒ Calculer le temps de coagulation en secondes nécessaire pour l'apparition des premiers grumeaux (flocons) de lait sur la paroi des tubes ;
- ☒ Après détermination de l'activité coagulante, procéder au dosage des protéines de l'extrait brut enzymatique de concombre par la méthode de Bradford ;

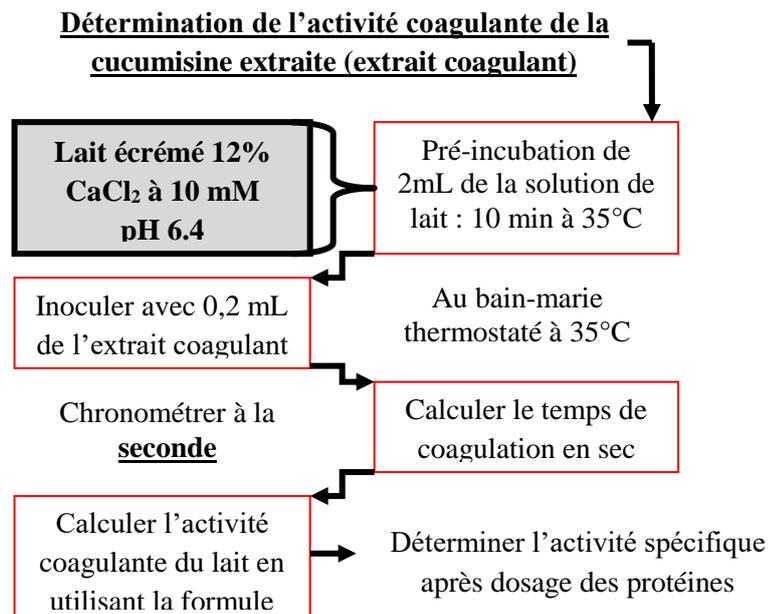


Figure 1. Schéma récapitulatif de l'ensemble des étapes à suivre pour la détermination de l'activité coagulante de l'extrait brut enzymatique de concombre.

7. Expression des résultats

- ☒ Calculer l'activité coagulante du lait de l'extrait enzymatique de concombre en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité coagulante (U/mL)} = \frac{2400 * V}{Tc * v}$$

V : volume du lait en mL ;

Tc : temps de floculation en sec ;

v : volume de la solution enzymatique en mL ;

L'activité coagulante représente le volume du lait coagulable par unité de volume d'une enzyme ou d'un extrait enzymatique, en 40 minutes (2400 sec), à 35°C et pH égale à 6,4.

- ☒ Calculer la concentration en protéines de l'extrait brut enzymatique du concombre en utilisant la courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines (TP N° 05).
- ☒ Calculer l'activité spécifique de l'extrait coagulant.

L'activité spécifique est définie comme étant le rapport entre l'activité coagulante et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique et exprimée en U/mg : Activité spécifique = activité coagulante (U) / teneur en protéines (mg).